

筋萎縮性側索硬化症のモデルとしてのヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入トランスジェニックラットの 作製

著者	永井 真貴子
号	1743
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/22129

氏 名（本籍） ^{なが}永 ^い井 ^ま真 ^き貴 ^こ子

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学位記番号 医博第 1743 号

学位授与年月日 平成 13 年 3 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 筋萎縮性側索硬化症のモデルとしてのヒト変異
Cu/Zn SOD 遺伝子導入トランスジェニックラッ
トの作製

(主 查)

論文審査委員 教授 糸山泰人 教授 北本哲之

教授 野田 哲 生

論文内容要旨

研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性に運動ニューロンが変性し死に至る神経変性疾患である。家族性 ALS（FALS）の原因遺伝子の一つとして Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ（Cu/Zn SOD）が報告されており、FALS の約 20% にこの遺伝子の変異が認められている。本研究では ALS の病態解明のために、FALS 患者で報告された Cu/Zn SOD 遺伝子異常を導入したトランスジェニック（Tg）ラットを作製する。

研究方法

PAC ライブラリーからプロモーター領域を含むヒト Cu/Zn SOD 遺伝子の全長をクローニングし、Oligonucleotide-directed Dual Amber 法で 46 番目のアミノ酸がヒスチジン（CAT）からアルギニン（CGT）に変わる点突然変異（H46R）を導入した。これを SD ラット受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg ラットを作製した。生まれたラットの尾から DNA を抽出し、PCR 法とサザンブロッティングで導入遺伝子を確認した。ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子の導入が確認できた Tg ラットではその臓器を摘出し、ウェスタンブロッティングでヒト変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量を検討し、脊髄における Cu/Zn SOD 活性を検討した。さらに Tg ラットの発症からの臨床経過および病理を検討した。

研究結果

Tg ラットは 5 系統が得られた。そのなかで導入遺伝子のコピー数が多く、ヒト変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量が多く認められた Tg ラットのラインでは、進行性の筋脱力、筋萎縮という運動ニューロンの選択的な障害が見られ、約 1 ヶ月の経過で死に至った。H46R 変異は銅との結合部位に存在するため、脊髄における Cu/Zn SOD 活性は導入蛋白の多い Tg ラットほど低下していた。神経病理では主に脊髄前角が障害され、特に腰髄において運動ニューロンが変性消失しアストロサイトとミクログリアの増生が著しく認められた。変性した運動ニューロンにはエオジン好性の円形の硝子様封入体が見られ、抗ユビキチン抗体で染色された。また、腫大し蛇行した軸索が見られた。これらの所見は ALS 患者の病理所見で認められる変化と類似した所見であった。

結論

ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入した Tg ラットは、ALS 様の症状および病理像を呈し、

ALS のモデル動物として今後の病態解明に有用であると考えられた。

研究の意義・独創的な点

これまで ALS のモデル動物として Tg マウスが作製されてきたが，病態の主座である脊髄が小さく病理学的検討や蛋白質などの解析が充分にできないことが問題であった。今回初めてラットで ALS のモデル動物を作製したことでこの問題点が解消され，さらに髄液の解析，治療実験として髄腔内投与が可能になるなど今後の ALS の病態解明に有用なモデルであると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性に運動ニューロンが変性し死に至る神経変性疾患である。家族性 ALS（FALS）の原因遺伝子の一つとして Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ（Cu/Zn SOD）が報告されており、FALS の約20%にこの遺伝子の変異が認められている。本研究では ALS の病態解明のために、FALS 患者で報告された Cu/Zn SOD 遺伝子異常を導入したトランスジェニック（Tg）ラットを作製することを目的とする。

PAC ライブラリーからプロモーター領域を含むヒト Cu/Zn SOD 遺伝子の全長をクローニングし、Oligonucleotide-directed Dual Amber 法で46番目のアミノ酸がヒスチジン（CAT）からアルギニン（CGT）に変わる点突然変異（H46R）を導入した。これを SD ラット受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg ラットを作製した。生まれたラットの尾から DNA を抽出し、PCR 法とサザンブロッティングで導入遺伝子を確認した。ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子の導入が確認できた Tg ラットではその臓器を摘出し、ウェスタンブロッティングでヒト変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量を検討し、脊髄における Cu/Zn SOD 活性を検討した。さらに Tg ラットの発症からの臨床経過および病理を検討した。

その結果、Tg ラットは5系統が得られた。そのなかで導入遺伝子のコピー数が多く、ヒト変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量が多く認められた Tg ラットのラインでは、進行性の筋脱力、筋萎縮という運動ニューロンの選択的な障害が見られ、約1ヶ月の経過で死に至った。H46R 変異は銅との結合部位に存在するため、脊髄における Cu/Zn SOD 活性は導入蛋白の多い Tg ラットほど低下していた。神経病理では主に脊髄前角が障害され、特に腰髄において運動ニューロンが変性消失しアストロサイトとミクログリアの増生が著しく認められた。変性した運動ニューロンにはエオジン好性の円形の硝子様封入体がみられ、抗ユビキチン抗体で染色された。また、腫大し蛇行した軸索がみられた。これらの所見は ALS 患者の病理所見で認められる変化と類似した所見であった。

ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子を導入した Tg ラットは、ALS 様の症状および病理像を呈し、ALS のモデル動物として今後の病態解明に有用であると考えられた。これまで ALS のモデル動物として Tg マウスが作製されてきたが、病態の主座である脊髄が小さく病理学的検討や蛋白質などの解析が十分にできないことが問題であった。今回初めてラットで ALS のモデル動物を作製したことでこの問題点が解消され、さらに髄液の解析、治療実験として髄腔内投与が可能になるなど今後の ALS の病態解明に有用なモデルであると考えられ、学位に値する研究と考えられる。